Agronomía Trop. 60(3): 263-269. 2010

ANALISIS RAPD ENTRE Y DENTRO DE POBLACIONES DERIVADAS DE GIRASOL SILVESTRE X CULTIVADO

RAPD ANALYSIS BETWEEN AND WITHIN POPULATIONS DERIVED FROM WILD X CULTIVATED SUNFLOWER

Hilda Fernandez*, Enio Soto*, Efraín Salazar* y Maira Betancourt**

*Investigadores e **Ingeniera Agrónoma, contratada. INIA-CENIAP. Estado Aragua. Venezuela.
Email: hfernandez@inia.gob.ve, hilfergon@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue estimar las relaciones genéticas (RG) entre 10 poblaciones generadas mediante cruces de girasol silvestre por la línea cultivada HA-89 utilizándose 26 marcadores RAPD. Se procedió a la siembra de los materiales en invernadero para obtener las hojas jóvenes y sanas, aislándose el ADN según el protocolo de Doyle and Doyle (1990), éste se cuantificó y diluyó a una concentración aproximada de 15 ng μl^{-1}, luego se amplificó en presencia de la enzima Taq polimerasa con los 30 iniciadores aleatorios decámeros de la compañía Operón Technologies. Los productos de amplificación son separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2%, visualizados y analizados con el equipo ChemiDoc-It™, software Quantity One®, para luego construir las matrices binarias (0,1) a partir de las cuales se realizó el análisis estadístico. Para estimar las RG dentro y entre las poblaciones, se utilizó el coeficiente de asociación Simple Matching y las mismas se representaron en un dendrograma construido con el método de Ward, apreciando que la población con pedigrí *H. deserticola* se ubicó más cerca a la línea cultivada HA-89 y *H. anomalus* resultó ser la más distante.

Palabras Clave: girasol cultivado y silvestre; RAPD; relaciones genéticas.

SUMMARY

This study aimed to estimate genetic relationships (RG) among 10 populations generated by crossing wild sunflower with HA-89 cultivated line, 26 RAPD markers were used. Plants were grown under greenhouse conditions to obtain young and healthy leaves, from which DNA was isolated following the protocol of Doyle and Doyle (1990). Isolated DNA was quantified and diluted to a concentration of 15 ng ul^{-1}, and then amplified in the presence of Taq polymerase with 30 random decameric primers by Operon Technologies. Amplification products were electrophoretically separated in 1,2% agarose gels. They were visualized and analyzed on a Biorad's Chemidoc digitalyzer using the Quantity One ® software v. 4.2. Binary matrices (0,1) were made, from which statistical analysis was done. To estimate the genetic relationships within and between populations, simple matching association coefficient was used, and phenetic relationships were represented in a dendrogram constructed with the Ward method. Population with *H. deserticola* pedigree was the one located closest to the cultivated line HA-89 and population with *H. anomalus* pedigree was the most distant.

Key Words: cultivated and wild sunflower; genetic relations; RAPD.

RECIBIDO: noviembre 22, 2010

ACEPTADO: abril 25, 2011

INTRODUCCIÓN

En Venezuela el cultivo de girasol, *Helianthus annuus* L., es una alternativa valiosa para suplir el gran déficit en materias grasas existente en el país, razón por la cual se debería incentivar la siembra a gran escala y de este modo evitar que el Estado venezolano erogue significativas sumas de divisas en importaciones, tanto de materia prima como de semilla.

Además, el aceite de girasol es rico en ácidos grasos insaturados, como el ácido oleico, que a su vez le confiere mayor estabilidad. El cultivo presenta ventajas comparativas respecto a otros rubros, sobre todo en períodos lluviosos y la cosecha es totalmente mecanizada (Soto y Fernández, 1997; Fernández y Soto, 1998; Soto, 2005).

Las especies silvestres del género *Helianthus* constituyen una importante reserva de la variabilidad genética para el girasol cultivado. La hibridación entre este germoplasma y el silvestre es ampliamente utilizada para su mejoramiento genético. La mayor fuente de androesterilidad citoplásmica proviene del girasol anual silvestre, *Helianthus petiolaris* (Leclercq, 1969). Por otro lado, se utilizó exitosamente una amplia gama de recursos genéticos como fuente de resistencia a plagas y enfermedades (Seiler, 2010).

La hibridación interespecífica se empleó con el objetivo de introducir variación en la restauración de la fertilidad, balancear la proporción de ácidos grasos, inducir la tolerancia a la sequía y sales (Laferrière, 1986; Seiler, 1992; Fick y Miller, 1997; Jan, 1997), incrementar la concentración de aceite y mejorar la adaptabilidad de la planta a ambientes secos, como es el caso de las hibridaciones con *H. anomalus* Blake y *H. deserticola* Heiser (Seiler, 2007).

Asimismo, los experimentos relacionados con cruzamientos interespecíficos contribuyeron al conocimiento de los mecanismos de evolución en las plantas, especialmente el relacionado con la hibridación (Rieseberg *et al*., 1995; Rieseberg, 1996).

En girasol, los marcadores RAPD se emplearon por diferentes autores como Nandini y Chikkadevaliah (2005), quienes analizaron las relaciones filogenéticas entre híbridos, líneas parentales y variedades; Liu *et al*. (2003), por su parte, utilizaron el análisis RAPD junto al AFLP para determinar las RG entre 23 cultivares élite de girasol de uso confitero; Pankovic *et al*. (1997), estudiaron las distancias genéticas entre líneas de este cultivo; Besnard *et al*. (1997), analizaron las regiones específicas de introgresión en cultivares de *H. argophyllus* para marcar genes de resistencia al hongo Phomopsis. De este modo, Lawson *et al*. (1998) realizaron estudios sobre genes relacionados con resistencia a la sequía y Encheva *et al*. (2005) analizaron híbridos intergenéricos entre *H. annuus* L. y *Verbesina helianthoides* (Genus verbesina).

En Venezuela, la técnica RAPD fue utilizada por diversos autores, entre los que destacan Salazar *et al*. (2006) en la identificación de genotipos de ajonjolí y Pérez-Almeida *et al*. (2010) en el estudio de la diversidad genética en seis especies de *Passiflora*.

Con respecto a las relaciones genéticas (RG), su conocimiento entre variedades y especies permite elegir progenitores, así como, evaluar y caracterizar los recursos genéticos disponibles para hacer un uso más eficiente de la variabilidad genética (Lu *et al*., 1994). El coeficiente de coancestría (f_{AB}) propuesto por Malécot (1948) se utilizó tradicionalmente como una medida de la RG entre dos genotipos para determinar el tamaño poblacional en cultivos alogamos, pero su uso se limitó últimamente a varios cultivos porque sus estimados no siempre expresan la verdadera RG, basándose en premisas como la herencia mendeliana y la contribución similar de ambos progenitores en ausencia de selección y otras causas de deriva genética que son irreales en materiales mejorados (Hunter, 1989). Además, no se dispone en muchos casos de los datos genealógicos requeridos para su cálculo (Cox *et al*., 1986).

Los marcadores moleculares, basados en el polimorfismo de ADN, expresan semejanza entre genotipos por muestreo directo del genoma (Messmer *et al*., 1993) y a diferencia del coeficiente de coancestria (f_{AB}), estiman la proporción de alelos idénticos.

El objetivo de este trabajo fue estimar las RG entre y dentro de 10 poblaciones generadas mediante cruces de girasol silvestre x la línea cultivada HA-89, que facilitan el manejo de la colección y su uso en programas de mejoramiento genético.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

En este trabajo se estudiaron 10 poblaciones generadas mediante cruzamientos interespecíficos entre las especies anuales *H. anomalus*, *H. praecox*, *H. deserticola* y la perenne *H. tuberosus* por la línea cultivada HA-89,

realizados por el departamento de Estados Unidos, Fargo Dakota del Norte (Seiler, 1991, 1993). Estos materiales pertenecen al Banco de Germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-CENIAP), son seleccionados para demostrar el buen comportamiento agronómico y, por consiguiente, buena adaptación a las condiciones edafoclimáticas de Venezuela (Cuadro 1).

Análisis RAPD

Para la extracción de ADN se procedió a la siembra en invernadero de tres réplicas por cada población, con el propósito de determinar la variabilidad dentro y entre las poblaciones. Dos semanas después de la germinación, se colectaron 0,250 g de hojas jóvenes y sanas, aislándose el ADN de cada una de las plantas por separado, siguiendo el protocolo de Doyle and Doyle (1990).

Este ADN se cuantificó y diluyó a una concentración aproximada de 15 ng μl^{-1}, luego se amplificó en presencia de la enzima Taq polimerasa con los 30 iniciadores aleatorios decámeros de la compañía Operón Technologies. Los productos de este proceso son separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2%, visualizados y analizados con el equipo ChemiDoc-It™, software Quantity One®. Los patrones de bandas obtenidos fueron codificados como cero y uno para fragmentos ausentes y presentes, respectivamente, para luego construir una matriz binaria que permitió realizar el análisis estadístico.

Análisis de los datos

Las RG fueron estimadas a partir de los patrones de bandas generados para el conjunto de *loci* estudiados. La similitud entre los genotipos se evaluó a través del coeficiente de asociación de concordancia Simple Matching (Sokal *et al*., 1958), recomendado por Powell *et al*. (1996) y Laurentin (2009) para marcadores dominantes como los RAPD.

Con los valores obtenidos se construyó una matriz de similitud, basado en los resultados se graficó un dendrograma usando el método de Ward (InfoStat, 2004). Para comprobar la eficiencia y bondad de ajuste del agrupamiento, se calculó el coeficiente de correlación cofenética r, mediante el test de Mantel (Mantel, 1967) que estima la relación entre la matriz cofenética lograda a partir del dendograma y la matriz de similitud original (Sokal y Rohlf, 1994). Estos cálculos se realizan mediante los programas estadísticos InfoStat versión 2007p y NTSYSpc versión 2.20L (Exeter software, 2000).

CUADRO 1. Nombre de los genotipos estudiados, código de campo y número asignado a cada población.

Genotipo	Código de campo	Población
HA-89	04-075	1
H. desertícola	091-1474-3	2
H. tuberosus	097-1789	3
H. tuberosus	108-1709-3	4
H. tuberosus	110-1709-3	5
H. tuberosus	126-1709-3	6
H. tuberosus	156-1709-1	7
H. anomalus	168-1509-2	8
H. praecox	179-1671-2	9
H. anomalus	207-1509-2	10

El contenido de información polimórfica (según sus siglas en inglés PIC) de cada marcador se utilizó para evaluar la capacidad de los iniciadores en detectar locus polimórficos y su frecuencia en los genotipos estudiados (Anderson *et al*., 1993); el mismo se calculó de acuerdo a Roldan-Ruiz *et al*. (2000), mediante la fórmula:

$$PIC = 2\, fi\, (1-fi)$$

Donde:

PIC = PIC del marcador **i**;
fi = frecuencia de las bandas donde está presente el marcador;
(1-fi) = frecuencia de las bandas ausentes del marcador.

El valor de PIC en los marcadores RAPD tiene un máximo valor de 0,5, cuando la mitad de los individuos tienen la banda y la otra mitad no la tienen (De Riek *et al*., 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los 26 iniciadores utilizados se produjo un total de 229 bandas polimórficas, tanto para la línea cultivada HA-89 como para las poblaciones derivadas; el mayor número lo presentó OPB09 con 15 y OPY09 con 14, el menor número se derivó por el OPF12 y K03 con 4.

La Figura 1 muestra los diferentes perfiles electroforéticos obtenidos para 16 poblaciones de las 30 estudiadas con el iniciador 0PW06, donde se observó que las tres réplicas de *H. praecox* (carriles 11, 12, y 13) presentan un perfil idéntico con este iniciador.

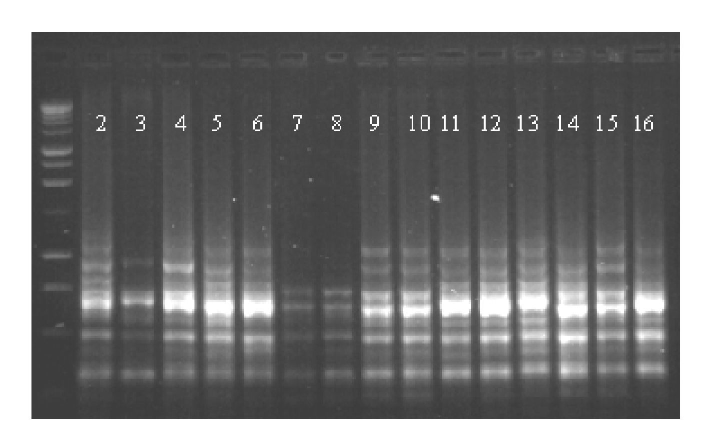


FIGURA 1. Perfil RAPD con el iniciador OPW06 en gel de agarosa al 1,2%, de *H. tuberosus* ramificado (carriles 2, 3, 4), *H. tuberosus* sin ramificación (carril 5, 6, 7), *H. anomalus* sin ramificación (carriles 8, 9,10), *H. praecox* (carriles 11, 12,13) y repetición de *H. anomalus* sin ramificación (carriles 14,15, 16).

El valor promedio del PIC fue de 0,37, con un mínimo de 0,23 del iniciador OPK05 y máximo de 0,50 del OPM04 (Cuadro 2). Un elevado valor presentado del 50% de los iniciadores utilizados indicó el gran poder discriminatorio de estos marcadores al diferenciar los genotipos estudiados, empleándose como referencia en sucesivas investigaciones. Estos resultados coinciden con los obtenidos para marcadores RAPD por Liu *et al*. (2003), quienes aplicaron 26 iniciadores para determinar las RG en líneas élite de girasol de uso confitero, encontrando que el 86% de estos fueron polimórficos, y el PIC alcanzó un promedio de 0,41, separándose los genotipos estudiados en grupos heteróticos.

El dendrograma obtenido presentó un coeficiente de correlación cofenética de 0,679; representando un valor intermedio de ajuste entre éste y la matriz de similitud original (Figura 2). Sin embargo, las poblaciones lograron diferenciarse y las relaciones de similitud alcanzadas mostraron la formación de cinco grupos: el primero, constituido por la línea cultivada HA-89, dos de *H. desertícola* (DES) y dos de *H. tuberusus* no ramificado (TUB). El segundo, conformado por cuatro de *H. tuberosus* no ramificado (TUB); el tercero, compuesto por una población de *H. desertícola*, tres de *H. tuberosus* no ramificado (TUB) y dos de *H. tuberosus* ramificado (TUBN); el cuarto, por una de *H. tuberosus* ramificado (TUBN), dos de *H. tuberosus* no ramificado (TUB) y tres de *H. praecox* (PRA), y el quinto por las *H. anomalus* (ANO).

CUADRO 2. Iniciadores utilizados, número de bandas, porcentaje de bandas polimórficas y contenido de información polimórfica (PIC).

Iniciador	Número de bandas	Bandas polimórficas	PIC
OPA01	8	100%	0,39
OPA02	8	100%	0,42
OPA04	8	100%	0,47
OPA09	6	100%	0,32
OPA10	6	100%	0,32
OPA17	8	100%	0,34
OPA19	12	100%	0,30
OPB07	8	100%	0,40
OPB09	15	100%	0,32
OPF12	4	100%	0,38
OPF14	11	100%	0,43
OPK03	4	100%	0,31
OPK05	14	100%	0,23
OPK09	6	100%	0,28
OPK15	8	100%	0,40
OPK20	7	100%	0,47
OPM04	12	100%	0,50
OPM09	6	100%	0.35
OPM10	8	100%	0,30
OPM20	10	100%	0,42
OP010	11	100%	0,31
OPW06	11	100%	0,49
OPY03	8	100%	0,32
OPY07	8	100%	0,45
OPY09	14	100%	0,38
OPY17	8	100%	0,43
PROMEDIO	8,81	100%	0,37

Con respecto a las RG de las 10 poblaciones con la línea cultivada HA-89, se puede apreciar en el dendrograma, dos con pedigrí *H. desertícola* que se ubicaron más cerca a la línea HA-89, seguidas de la misma cantidad de *H. tuberosus* no ramificado, y la más distante resultó ser la conformada con pedigrí *H. anomalus*.

De esta manera, se observó que dentro de las poblaciones todavía se conserva la pureza varietal, puesto que se agruparon como se esperaba; donde la tres y la cuatro de *H. tuberosus* presentaron mayor similitud con el coeficiente más bajo de distancia (0,40), y las más disimiles fueron las de *H. desertícola* con 0,58.

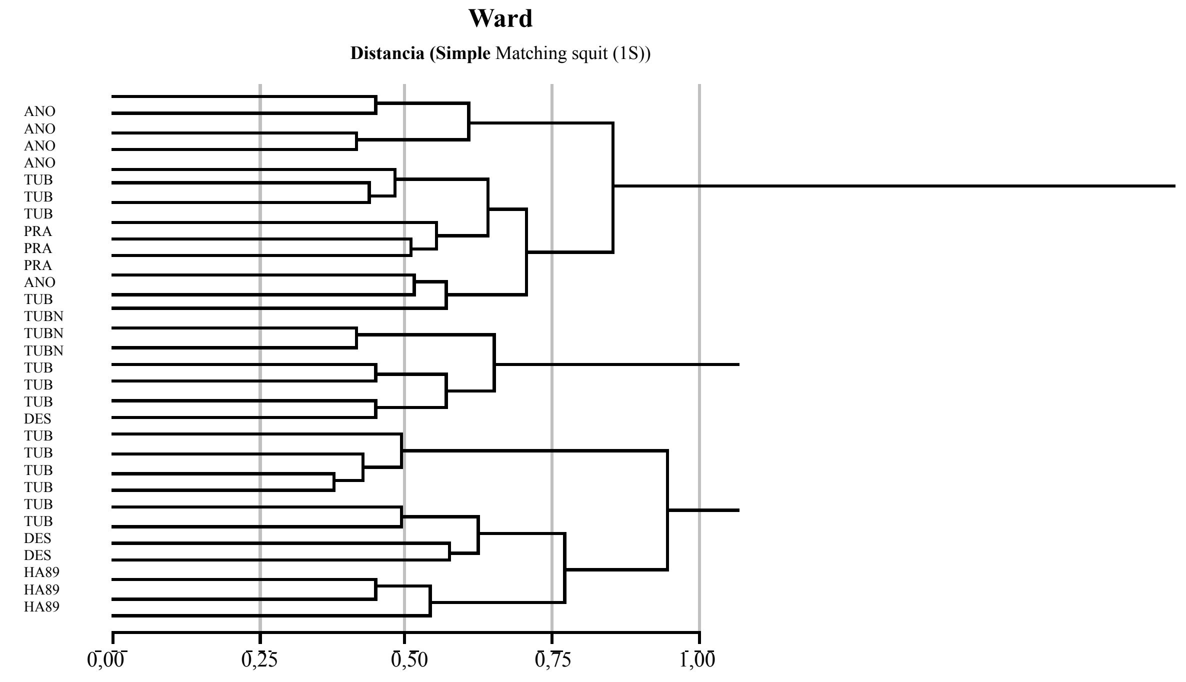


FIGURA 2. Dendrograma RAPD mostrando las relaciones genéticas entre las 10 poblaciones estudiadas.

Con el resultado del agrupamiento se pudo observar que entre las poblaciones (posiblemente en el proceso de manipulación y autofecundación) ocurrió contaminación por polen, tal es el caso en el grupo tres, de *H. deserticola* con *H. tuberosus*; los cuales se situaron en el dendrograma, a una distancia inferior a 0,50; y en el grupo cuatro, una de *H. tuberosus* con *H. anomalus*, ubicadas a 0,53.

CONCLUSIONES

- El análisis RAPD de los 26 iniciadores utilizados permitió detectar las poblaciones de girasol silvestre más cercanas genéticamente a la línea cultivada HA-89 y la pureza varietal de las mismas, facilitando así, el manejo de la colección y su uso en programas de mejoramiento genético, confirmando una vez más, la utilidad de los marcadores RAPD para establecer RG y diferenciar materiales, con el propósito de mejorar la productividad de las especies.

AGRADECIMIENTO

Al profesor Gian Paolo Vannozzi por la donación del germoplasma evaluado.

BIBLIOGRAFÍA

Anderson, J. A., G. A. Churchill, J. E. Autrique, S. D. Tanksley, M. E. Sorrells. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. Genome. 36(1):181-186.

Besnard, G., Y. Griveau, M. C. Quillet, H. Serieys, P. Lambert, D. Vares and A. Bervillé. 1997. Specifying the introgressed regions from *H. argophyllus* in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) to mark Phomopsis resistance genes. Theor Appl. Genet. 94(1):131-138.

Cox, T. S., J. P. Murphy and D. M. Rodgers. 1986. Changes in genetic diversity in the red winter wheat regions of the Unite States. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 83(15):5 583-5 586.

De Riek, J., E. Calsyn, I. Everaert, M. De Loose. 2001. AFLP based alternatives for the assesment of distincteness, uniformity and stabilty of sugar beet varieties. Tag Theoretical and Applied Genetics. 103(8):1 254-1 265.

Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12(1):13-15.

Encheva, J., H. Köhler, M. Christov and W. Friedt. 2005. Intergeneric hybrids between cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) and *Verbesina helianthoides* (GENUS Verbesina)-RAPD Analysis. Helia. 28(42):37-44.

Exeter software. 2000. NTSYSpc ver.2.20. Applied Biostatistics.

Fernández, H. y E. Soto 1998. The present status and prospects for sunflower in Venezuela Helia, 21(29):137-144.

Fick, G. and J. Miller 1997. Sunflower breeding, **In:** Sunflower technology and production. (ed. A. Schneiter) ASA-CSSA-SSSA. (15):395-439.

Hunter, R. B. 1989. ASTA approach on minimum distance. **In:** Wilkinson D (ed.) Proc 44th Annual Corn Sorghum Industry. Res. Conf. 44:193-195.

InfoStat, 2004. Versión 2004. Manual del usuario, 1ª ed. Córdoba, Argentina.

InfoStat, 2007. Versión 2007p. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Cordoba, Argentina.

Jan, C. C. 1997. Cytology and interspecific hybridization. **In:** Sunflower technology and production. ASA-CSSA-SSSA. Madison. 497-558 pp.

Laferrière, J. E. 1986. Interspecific hybridization in sunflowers: an illustration of the importance of wild genetic resources in plant breeding. Outlook on Agriculture. 15:104-129.

Laurentin, H. 2009. Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. Genet. Resour. Crop. Evol. 56:277-292.

Lawson, W. R., K. C. Goulter, R. J. Henry, G. A. Kong and J. K. Kochman. 1998. Marker-assisted selection for two rust resistance genes in sunflower. Mol. Breed. 4:227-234.

Leclercq, P. 1969. Une stérilité male cytoplasmique chez le tournesol. Ann. Amelior. Plant. 19:99-106.

Liu, J., G. S. Liu and C. C. Jan. 2003. Comparison of genetic diversity of the germplasm resources of confectionary sunflower (*Helianthus annuus* L.) in China based on RAPDs and AFLPs. Acta Bot. Sinica. 45(3):352-358.

Lu. Y. H., A. D'Hont, F. Paulet, L. Grivet, M. Arnaud and J. C. Glaszmann. 1994. Molecular diversity and genome structure in modern sugarcane varieties. Euphytica. 78:217-226.

Malécot G. 1948. Les mathématiques de l'hérédité. Paris: Masson and Cie.

Mantel, N. A. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res., 27(2):209-220.

Messmer, M. M., A. E. Melchinger, R. Herman and J. GyBoppenmayer. 1993. Relationship among early European maize inbreds: II: Comparison of pedigree with RFLPdata, Crop Science, 33:944-950.

Nandini, R. and J. N. Chikkadevaiak. 2005. DNA Fingerprinting of sunflower genotypes (*Helianthus annuus* L.). Helia. 28(42):9-18.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics. 89(3):583-590.

Pankovic, D., M. Mihaljcevic and D. Skoric.1997. Determination of genetic distance between different sunflower lines with Rapd markers. **In:** I Symposium on molecular genetics and I Symposium on mutagenesis and genotoxicology. Zlatibor, Yugoslavia. 34 p.

Pérez-Almeida, I., S. Vásquez, D. Pérez y E. Salazar. 2010. Diversidad genética en seis especies de *Passiflora* spp. utilizando RAPD. Rev. Fac. Agron. 27:347-359.

Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding. 2(3):225-238.

Rieseberg, L. H., A. M. Desrochers and S. J Young. 1995. Interspecific pollen competition as a reproductive barrier between sympatric species of *Helianthus* (Asteraceae). Am. J. Bot. 82(4):515-519.

Rieseberg, L. H. 1996. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. Molecular Ecology. 5:99-105.

Roldán-Ruiz, I., J. Dendauw, E. Van Bocktaele, A. Depicke and M. De Loose. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrass (*Lolium* spp.). Mol. Breed. 6:125-134.

Salazar, B., H. Laurentin, M. Davila and M. Castillo. 2006. Reliability of the RAPD technique for germoplasm analisys of sesame (*Sesasumum indicum* L.) from Venezuela. Interciencia. 31(6):456-4.

Seiler, G. J. 1991. Registration of six interspecific sunflower germplasm lines derived from wild perennial species. Crop Sci. 31:1097-1098.

Seiler, G. J. 1992. Utilization of wild sunflower species for the improvement of cultivated sunflower. Field Crops Res. 30(3-4):195-230.

Seiler, G. J. 1993. Registration of six interspecific germplasm lines derived from wild perennials sunflower. Crop Sci. 33:1 110-1 111.

Seiler, G. J. 2007. Wild annual Helianthus anomalus and H. deserticola for improving oil content and quality in sunflower. Industrial Crops Products. 25(1):95-100.

Seiler, G. J. 2010. Utilization of wild *Helianthus* species in breeding for disease resistance. Proceedings of the International Symposium: "Sunflower breeding on resistance to disease", Krasnodar, Russia. 36 p.

Sokal, R. R. y F. J. Rohlf. 1994. Biometría: los principios y la práctica de la estadística en la investigación biológica. 3ra ed. Nueva York: Freeman.

Sokal, R. R. and C. D. Michener. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. Univ Kansas Aci Bull. 38:1 409-1 438.

Soto, E. y H. Fernández. 1997. El girasol en Venezuela. Fonaiap Divulga. N° 56, Abril-Junio. Maracay, estado Aragua. Venezuela.

Soto, E. 2005. El cultivo del girasol en Venezuela. Revista Digital Ceniap Hoy, N° 9. Septiembre-Diciembre. Maracay, estado Aragua. Venezuela.